

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ NOUVELLES COMPOSITIONS D'INOCULA FONGIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEUR APPLICATION A L'AMELIORATION DE LA CROISSANCE DES CULTURES.

②② Date de dépôt : 23.12.10.

③③ Priorité :

⑥③ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.) — FR , UNIVERSITE CADI AYYAD-FACTULTE DES SCIENCES SEMLALIA, MARRAKECH-MAROC — MA et CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT (CIRAD) — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 29.06.12 Bulletin 12/26.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 23.10.15 Bulletin 15/43.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦② Inventeur(s) : DUPONNOIS ROBIN, HAFIDI MOHAMED, PRIN YVES et OUHDOUCH YADIR.

⑦③ Titulaire(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.), UNIVERSITE CADI AYYAD-FACTULTE DES SCIENCES SEMLALIA, MARRAKECH-MAROC, CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT (CIRAD).

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMACHY Société à responsabilité limitée.



NOUVELLES COMPOSITIONS D'INOCULA FONGIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEUR APPLICATION A L'AMELIORATION DE LA CROISSANCE DES CULTURES

5

La présente invention concerne de nouvelles compositions d'inocula fongiques, leur procédé de préparation et leur application à l'amélioration de la croissance des cultures.

10

La mycorhization est une association à bénéfice mutuel entre un végétal et un champignon mycorhizien

15

L'importance des champignons mycorhiziens dans les plantations forestières a été mise en évidence pour la première fois en 1910 dans des essais d'introduction de pins exotiques au Kenya. Alors que ces plantations se soldaient généralement par des échecs spectaculaires (plants chlorotiques, mortalité très élevée), sur les conseils du "Royal Botanic Gardens", du sol de vieilles plantations de pins fut importé d'Afrique du Sud afin d'être utilisé comme substrat de culture en pépinière.

20

En effet, ce sol contenait des mycorhizes qui sont des organes mixtes situés sur les racines des végétaux, formés par la juxtaposition de deux types d'organismes : la plante supérieure et les filaments mycéliens souterrains du champignon. Les champignons vont puiser dans le sol les éléments minéraux, et plus particulièrement les moins mobiles tels que le zinc, le cuivre et le phosphore, indispensables au développement de celle-ci et qu'ils vont procurer à la plante. En échange, la plante donne au champignon des sucres et des substances de croissance assurant ainsi sa survie. Les mycorhizes jouent un rôle important dans l'assimilation de certaines formes d'azote ainsi que dans l'absorption de l'eau du sol.

25

Cette technique employant un sol riche en propagules fongiques mycorhiziennes fut rapidement divulguée avec succès dans d'autres pays d'Afrique comme la Tanzanie, Ouganda, Malawi, etc.

30

Depuis, plusieurs techniques de mycorhization ont été développées et celle utilisant des champignons mycorhiziens seuls repose dorénavant sur les étapes suivantes : (i) isolement et purification de souches fongiques, (ii) sélection, en conditions contrôlées de souches fongiques performantes pour un paramètre donné (par exemple : effet de la souche sur la croissance de la plante hôte) et (iii) multiplication de la souche en conditions axéniques et production d'inocula fongiques.

On distingue deux types de champignons mycorhiziens, les champignons ectomycorhiziens qui concerne essentiellement les essences forestières et les champignons mycorhiziens à arbuscules qui concernent les espèces végétales herbacées.

En ce qui concerne les champignons ectomycorhiziens, plusieurs formulations d'inoculum ont été testées et ont montré des effets spectaculaires en pépinière.

Ainsi un inoculum de type billes d'alginate de calcium est décrit dans le brevet JP 3 091 855 qui concerne un procédé de préparation de mycorhizes de champignon mycorhizien par développement puis prélèvement de racines de pin rouge japonais, additionné à un mélange de mycélium, tel que *Trichola matsutake* Sing. avec de l'alginate de sodium, puis addition d'une solution de chlorure de calcium pour polymériser le mélange. Les racines recouvertes sont ensuite mises en culture pour former les mycorhizes du champignon mycorhizien.

Cependant, cet inoculum ne comprend pas de phosphate.

Par conséquent, cette composition implique l'emploi de phosphate extérieur pour apporter à la plante le phosphore (P) qui est un élément nutritif essentiel pour celle-ci, mais qui présente deux inconvénients majeurs qui sont, d'une part la très faible solubilité aqueuse du phosphate en sol non acide, et d'autre part une perte d'efficacité du phosphate du fait de la dispersion de la poudre dans le substrat de culture.

Pour réduire les déficiences en phosphore et assurer une bonne productivité des plantes, de grandes quantités de fertilisants à base de phosphore sous forme soluble sont employées. Cependant, jusqu'à 80% de l'amendement fertilisant en phosphore est perdu car il est facilement précipité en formes insolubles (CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 et AlPO_4) et devient non disponible pour la plante.

Une autre formulation comprend un inoculum associé à du phosphate inorganique. Ce type d'inoculum est par exemple décrit dans Ouahmane et al. (Responses of *Pinus halepensis* growth, soil microbial catabolic functions and phosphate-solubilizing bacteria after rock phosphate amendment and ectomycorrhizal inoculation; Plant soil, DOI 10.1007/s11104-008-9882-z) qui décrivent l'effet d'un champignon ectomycorhizien (*Pisolithus* sp.) sur la croissance de plants de pin (*Pinus halepensis*) en présence ou non de phosphate naturel. Les résultats montrent que lorsque que ledit champignon ectomycorhizien est utilisé en présence de phosphate, une synergie est alors observée sur la

croissance de la biomasse aérienne et/ou racinaire comparée à la croissance aérienne et/ou racinaire observée avec le phosphate seul ou le champignon seul.

Cependant, l'association champignon ectomycorhizien phosphate présente un inconvénient principal qui est la faiblesse de l'impact du champignon ectomycorhizien concernant sa capacité d'altération du phosphate inorganique.

Par conséquent, il existe un besoin de mettre à disposition des formulations non polluantes permettant de fournir aux plantes le phosphore nécessaire à leur croissance.

L'un des objets de l'invention est donc de fournir une formulation de champignon mycorhizien sous forme de granules enrobés dans une matrice permettant aux champignons mycorhiziens d'altérer les phosphates inorganiques complexes pour libérer des ions P biodisponibles pour la plante *via* des processus cultureux respectueux de l'environnement tout en évitant la dispersion du phosphate dans le sol.

Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé de préparation desdits granules.

La présente invention concerne des granules comprenant du phosphate inorganique, de la tourbe, au moins un inoculum mycorhizien, à l'exception de nutriments ou de germe de malt, lesdits granules étant enrobés dans une matrice à base d'au moins un hydrocolloïde polymérisé.

Par le terme « granules », il faut comprendre une petite particule ou un grain dont la taille peut être comprise d'environ 2 à environ 10 mm.

Par l'expression « phosphate inorganique », il faut comprendre tout phosphate inorganique, tel qu'un phosphate de roche (ou phosphate naturel) qui peut être trouvé dans différents pays tels que par exemple la nouvelle Zélande, le Pérou, l'Egypte ou le Maroc sans être limité à ceux-ci, ou de la podzolane, et qui permettra la libération de phosphore à la plante

Par l'expression « enrobé dans une matrice », il faut comprendre que les granules et ses constituants sont recouverts par l'hydrocolloïde polymérisé et restent donc dans la matrice, permettant ainsi de favoriser la capacité de l'inoculum ou champignon à solubiliser le phosphate inorganique lorsque les granules sont mis en contact avec la plante, et à rendre ainsi les ions phosphores accessibles de manière accrue à la plante, en les libérant à l'extérieur des granules pour que la plante puisse les utiliser.

Par le terme « nutriments », il faut comprendre les fertilisants pour plantes, notamment des fertilisants chimiques, organiques ou biologiques tels que par exemple des nutriments azotés, en particulier des nutriments contenant des composés ammonium, des amines ou des protéines animales.

5 Lesdits granules de phosphate inorganique enrobés dans une matrice à base d'au moins un hydrocolloïde polymérisé possèdent l'avantage d'être stables dans la matrice, ce qui signifie que les granules et ses constituants (phosphate, tourbe, champignon mycorhizien...) lorsqu'ils sont conservés à froid, c'est-à-dire entre 2 et 6°C, et ne sont pas en contact avec la plante ou un milieu aqueux, ne se dégradent pas et peuvent être conservés
10 ainsi de quelques jours à plusieurs mois, jusqu'à 6 mois.

La matrice représente le milieu dans lequel les constituants sont immobilisés et est constituée d'hydrocolloïdes, notamment un agent de fixation d'origine naturelle, végétale ou animale.

Lorsque les granules sont mis en contact avec une plante, le rôle de la symbiose
15 mycorhizienne sur le développement de la plante hôte sera optimisé en combinant intimement l'impact du champignon sur la plante directement (effet hormonal, minéral, etc) mais également indirectement par altération du phosphate inorganique permettant ainsi de libérer des ion phosphores à la plante.

Les inventeurs ont, de façon surprenante, trouvé que l'enrobage de phosphate avec de
20 la tourbe, un champignon mycorhizien et un hydrocolloïde sous forme de granules polymérisés permettait non seulement la solubilisation du phosphate et l'effet hormonal et minéral du champignon mais encore exerçait une action synergique sur la biomasse aérienne et racinaire des plantes comparée à la biomasse aérienne et racinaire obtenue avec des granules sans alginate ou sans phosphate lorsque les granules sont mises en contact
25 avec une plante.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, constitués de phosphate, de tourbe, d'au moins un inoculum mycorhizien, lesdits granules étant enrobés dans une matrice à base d'au moins un hydrocolloïde polymérisé.

Dans ce mode de réalisation, les granules ne contiennent que la tourbe, le phosphate
30 inorganique, l'inoculum et la matrice à l'exception de tout autre constituant.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels l'inoculum mycorhizien comprend au moins un champignon ectomycorhizien, du genre *Hebeloma*, et/ou du genre *Scleroderma*, et/ou du genre *Laccaria*,

5 On entend par champignon ectomycorhizien, un champignon dont le mycélium se développe entre les cellules du cortex racinaires, mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes, formant ainsi « le réseau intercellulaire de Hartig ». Il forme un manteau fongique autour de la racine. (Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition, UK, Academic Press.)

10 Dans un mode de réalisation avantageux, le champignon du genre *Hebeloma* est choisi parmi le groupe constitué de: *Hebeloma anthracophilum*, *Hebeloma cistophilum*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Hebeloma fastibile*, *Hebeloma mesophaeum*, *Hebeloma pallidum*, *Hebeloma radicosum*, *Hebeloma sarcophyllum* et *Hebeloma sinapizans*, en particulier *Hebeloma crustuliniforme*.

15 Dans un mode de réalisation avantageux, le champignon du genre *Scleroderma* est choisi parmi le groupe constitué de: *Scleroderma dyctiosporum* et *Scleroderma verrucosum* et préférentiellement *Scleroderma verrucosum*

Dans un mode de réalisation avantageux, le champignon du genre *Laccaria* est choisi parmi le groupe constitué de: *Laccaria amethystea*, *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*,
20 *Laccaria proxima*, *Laccaria purpureo-badia* et *Laccaria tortilis*, en particulier *Laccaria bicolor*.

Dans un mode de réalisation préféré du procédé décrit ci-dessus, le champignon ectomycorhizien est utilisé dans des espaces destinés aux cultures forestières.

25 Les cultures forestières comprennent notamment les myrtacées, les pinacées, les abietacées, les fagacées, les tiliacées, les ulmacées les salicacées; cette liste n'étant pas limitative.

Le terme « espaces destinés aux cultures » désigne ici ainsi que tout au long de la présente description, tout type de contenant comprenant des éléments appropriés à la culture tels que des pots, bacs, bocal, plaques alvéolées sans être limité à ceux-ci ainsi que tout
30 type de terrain, pièce de terre, champ, serre....

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans laquelle l'inoculum mycorhizien comprend au moins un champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus*.

On entend par champignon mycorhizien à arbuscules, un champignon, dont le mycélium pénètre les cellules racinaires et développe des arbuscules ou des vésicules, lorsqu'il est associé à des racines de plantes. Il ne forme pas de manteau fongique autour de la racine. (Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition, UK, Academic Press.)

Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, le champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus*, est choisi parmi le groupe constitué de: *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum* et *Glomus intraradices*, en particulier *Glomus intraradices*.

Selon encore un autre mode de réalisation du procédé ci-dessus, le champignon mycorhizien à arbuscules est utilisé dans des espaces destinés aux cultures, notamment céréalières, fourragères, maraîchères, fruitières ou horticoles et préférentiellement maraîchères, fruitières ou horticoles.

Les cultures céréalières comprennent notamment l'orge, l'avoine et le blé, cette liste n'étant pas limitative.

Par culture fourragère il faut comprendre les légumineuses telles que le trèfle, la luzerne et le lotier corniculé, et des graminées, comme la fléole des prés, le dactyle pelotonné, cette liste n'étant pas limitative.

Les cultures maraîchères comprennent notamment les tomates, les aubergines, les pommes de terre, les carottes, la laitue, le concombre, le melon, le chou, le chou-fleur...

Les cultures fruitières comprennent notamment des pommes, poires, pêches, raisin, cerises, prunes, agrumes, cette liste n'étant pas limitative.

Les cultures horticoles comprennent notamment les fleurs, les plantes ornementales, cette liste n'étant pas limitative.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans laquelle l'inoculum mycorhizien comprend au moins un champignon ectomycorhizien du genre *Hebeloma*, et/ou du genre *Scleroderma*, et/ou du genre *Laccaria*, et au moins un champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus*.

Dans un mode de réalisation avantageux, les champignons du genre *Hebeloma*, du genre *Scleroderma*, du genre *Laccaria* et du genre *Glomus* sont tels que définis ci-dessus.

Cette association de champignon ectomycorhizien et mycorhizien à arbuscules est plus particulièrement avantageuse pour les essences ligneuses à croissance rapide des genres *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Eucalyptus* et *Acacia* d'origine australienne.

Ces espèces forestières sont fréquemment utilisées dans les programmes de reboisement en milieu tropical humide et sec et l'association des deux types de champignons mycorhiziens permet d'obtenir des gains de croissance par rapport à ceux enregistrés quand un type seulement de champignon est inoculé.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels le poids d'inoculum mycorhizien est compris d'environ 0,05% (p/p) à 0,2% (p/p) en particulier 0,11% (p/p) par rapport au poids total des granules.

Les pourcentages sont exprimés en poids sec d'inoculum par rapport au poids des granules.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels le poids de tourbe est compris d'environ 2,2% (p/p) à environ 3,3% (p/p) en particulier 2,8% (p/p) par rapport au poids total des granules.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels le poids de phosphate inorganique est compris d'environ 36,7% (p/p) à environ 37,8% (p/p) en particulier 37% (p/p) par rapport au poids total des granules.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels le phosphate inorganique est du phosphate de roche ou de la podzolane.

La podzolane est une roche volcanique très riche en phosphore, complètement insoluble dans l'eau et qui ne peut être solubilisée que par un champignon mycorhizien.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels le phosphate inorganique est calibré à un diamètre d'environ 2 mm à environ 7 mm, en particulier 5 mm.

Le calibrage du phosphate permet d'homogénéiser l'apport de granules dans le sol. Des granules trop gros (plus de 7 mm) ne permettraient pas d'obtenir un contact rapide entre le symbiote et la plante (mort du mycélium).

Des granules trop petits (moins de 2 mm) n'offriraient pas une capacité minimale d'apport de mycélium fongique mais également une protection adéquate du champignon contre les variations environnementales du milieu (stress abiotiques).

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels le poids d'hydrocolloïde polymérisé est compris d'environ 1,7%(p/p) à environ 2,8%(p/p), en particulier 2,2%(p/p) par rapport au poids total des granules.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels ladite matrice est à base de chitosane, de carraghénanes, de carboxyméthylcellulose, d'alginate et en particulier d'alginate de sodium ou de calcium.

L'alginate de calcium peut être obtenu à partir d'alginate de sodium par échange d'ion, notamment par réaction de l'alginate de sodium avec un cation divalent tel que le chlorure de calcium, l'acétate de calcium, le carbonate de calcium, le phosphate de calcium, de préférence le chlorure de calcium.

Le chitosane est produit par désacétylation de la chitine présent dans l'exosquelette des insectes et autres arthropodes (crustacés, arachnides, etc.). C'est un polysaccharide aminé constitué de groupes N-acétyl-D-glucose-2-amine reliés entre eux par une liaison du type β -(1,4).

Les carraghénanes sont des polysaccharides linéaires constitués de molécules de galactose plus ou moins substituée. La chaîne est constituée de sous unités appelées carrabioses comprenant deux galactoses liés par une liaison β -(1,4). Ces carrabioses sont liés entre eux dans la chaîne par des liaisons α -(1,3).

La carboxyméthylcellulose est un polymère dérivé de la cellulose naturelle formé par réaction de la cellulose avec une base et de l'acide chloroacétique. Il est basé sur une structure β -(1,4)-D-glucopyranose.

Les alginates sont des polymères d'acide alginique (constitué d'acide mannuronique et d'acide guluronique) obtenus à partir d'algues brunes (Laminariales, Fucales). L'alginate de sodium est extrait des algues avec de la soude puis séché pour obtenir une poudre blanche, d'un poids moléculaire allant de 32 000 à 200 000 Da.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne des granules tels que définis ci-dessus, dans lesquels l'hydrocolloïde polymérisé est de l'alginat de calcium.

5 Selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation de granules comprenant notamment au moins un champignon ectomycorhizien, tels que définis ci-dessus, dans des espaces destinés aux cultures forestières.

10 Selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation de granules comprenant notamment au moins un champignon mycorhizien à arbuscules, tels que définis ci-dessus, dans des espaces destinés aux cultures, notamment céréalières, fourragères, maraîchères, fruitières ou horticoles et préférentiellement maraîchères, fruitières ou horticoles

15 Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation de granules comprenant notamment au moins un champignon ectomycorhizien, ou un champignon mycorhizien à arbuscules, dans laquelle la proportion de granule pour 100 ml de substrat contenant un élément unitaire de culture est comprise d'environ 0,05 % (p/v) à environ 0,5 % (p/v) en particulier 0,1 % (p/v).

Un autre avantage de l'invention consiste en l'optimisation des conditions de mycorhization et de solubilisation du phosphate permettant l'emploi de très faible quantité de granules.

20 Les containers utilisés pour la production de plants forestiers présentent un volume de 0,5 l à 1 litre. Pour un container de 0,5 l, le poids de granules sera d'environ 1 g par pot soit 0,2 g pour 100 ml de substrat

En dessous de 0,05%, la proportion de granules est trop faible pour observer une amélioration significative de la biomasse racinaire.

25 Au dessus de 0,5%, l'augmentation de la quantité de granules ne produit aucune amélioration substantielle par rapport à 0,5%.

L'expression « élément unitaire de culture » désigne ici une graine, semence, grain, fruit, pépin, noyau ou une plante sans être limité à ceux-ci permettant d'obtenir une culture forestière, céréalière, fourragère, maraîchère, fruitière ou horticole.

30 Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation de granules comprenant notamment au moins un champignon ectomycorhizien, et au moins un champignon mycorhizien à arbuscules, dans laquelle la proportion de granule pour 100 ml

de substrat contenant un élément unitaire de culture est comprise d'environ 0,05 % (p/p) à environ 0,5 % (p/p) en particulier 0,1 % (p/p).

Les containers utilisés sont les m[^]me que ci-dessus définis.

5 En dessous de 0,05%, la proportion de granules est trop faible pour observer une amélioration significative de la biomasse racinaire.

Au dessus de 0,5%, l'augmentation de la quantité de granules ne produit aucune amélioration substantielle par rapport à 0,5%.

10 Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé de préparation de granules tels que définis ci-dessus, comprenant une étape de polymérisation de granules de phosphate inorganique imprégnés de tourbe, d'au moins un inoculum mycorhizien et d'au moins un hydrocolloïde avec une solution aqueuse d'un cation divalent choisi parmi le chlorure de calcium, l'acétate de zinc, l'acétate de calcium, le carbonate de calcium, le phosphate de calcium, le chlorure d'aluminium ou des dialdéhydes.

15 Le contact de l'hydrocolloïde avec le cation divalent provoque la polymérisation dudit hydrocolloïde qui immobilise alors les différents constituants présents (inoculum mycorhizien, tourbe) enrobés sur les granules de phosphore.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un procédé de préparation de granules, tel que défini ci-dessus, comprenant les étapes suivantes:

- 20 a) multiplication d'au moins un mycélium mycorhizien en fermenteur sur un milieu nutritif adapté selon la souche fongique cultivée pour obtenir un mycélium mycorhizien multiplié,
- b) récolte dudit mycélium par filtration, lavage du mycélium à l'eau puis broyage pour obtenir un mycélium mycorhizien multiplié récolté,
- 25 c) calibrage de granules de phosphate inorganique, en particulier du phosphate de roche ou de la podzolane et lavage des granules à l'eau pour obtenir des granules calibrés lavés,
- d) préparation de la solution d'immersion pour les granules composée de :
- 30 i. au moins un hydrocolloïde,
- ii. de tourbe broyée préalablement stérilisée, et
- iii. de mycélium mycorhizien,

- e) immersion des granules calibrés lavés obtenus à l'étape c) dans la solution d'immersion pour obtenir des granules imprégnés d'hydrocolloïde, de tourbe et de mycélium,
- f) introduction des granules imprégnés dans une solution aqueuse d'un cation divalent pour obtenir des granules polymérisés,
- g) élimination des traces de cation divalent par un lavage à l'eau pour obtenir granules polymérisés lavés,

La multiplication et la récolte du mycélium sont effectuées selon Duponnois & Garbaye

(1991).

DUPONNOIS, R. & GARBAYE, J. (1991). Techniques for controlled synthesis of the Douglas fir-Laccaria laccata ectomycorrhizal symbiosis. *Annales des Sciences Forestières*, 48: 239-251.

La solution d'immersion est une solution aqueuse.

Le mélange des différents constituants est effectué à température ambiante, soit de 20 à 25°C.

L'hydrocolloïde est choisi parmi chitosane, de carraghénanes, de carboxyméthylcellulose, d'alginate et en particulier d'alginate de sodium ou de calcium.

De préférence, l'hydrocolloïde est un alginate de sodium.

L'hydrocolloïde est présent de 15g à 25g par litre de solution d'immersion, en particulier 20g. En dessous de 15g, la quantité d'hydrocolloïde est insuffisante pour obtenir une polymérisation correcte.

Au dessus de 25g, la proportion d'hydrocolloïde est trop importante par rapport aux autres constituants conduisant ainsi à des granules qui ne peuvent plus libérer les différents constituants.

La tourbe doit au préalable être broyée et stérilisée. Le broyage permet une homogénéisation de la solution d'immersion des granules. La stérilisation élimine les agents microbiens susceptibles d'entrer en compétition avec le champignon. Le broyage peut être effectué par tout appareil bien connu de l'homme du métier.

La proportion de tourbe est comprise de 20 à 30 g/l de solution d'immersion, en particulier 25 g/l.

La tourbe sert au support du mycélium, à acidifier le milieu pour un développement optimal du champignon (pH = 5,5)

L'immersion des granules dans la solution d'immersion est effectuée à température ambiante durant 60 min à 120 min, en particulier 90 min.

L'étape d'immersion a pour effet d'imprégner, c'est-à-dire d'adsorber l'hydrocolloïde, l'inoculum et la tourbe sur les granules de phosphate.

5 L'introduction ensuite des granules imprégnés d'hydrocolloïde, d'inoculum et de tourbe dans une solution aqueuse de cation divalent est effectuée à température ambiante durant 120 min à 180 min, en particulier 150 min.

Le cation divalent est choisi parmi le chlorure de calcium, l'acétate de zinc, l'acétate de calcium, le carbonate de calcium, le phosphate de calcium, le chlorure d'aluminium ou des
10 dialdéhydes et préférentiellement est le chlorure de calcium.

Cette étape a pour effet de faire polymériser l'hydrocolloïde sur les granules de phosphate immobilisant ainsi la tourbe et l'inoculum enrobés sur les granules de phosphate.

Après lavage, les granules sont récupérés et peuvent être conservés ainsi de quelques jours
15 à plusieurs mois, jusqu'à six mois, lorsque ceux-ci sont conservés à froid, c'est-à-dire entre 2 et 6°C, et préférentiellement 4°C.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un procédé de préparation de granules, tel que défini ci-dessus, dans lequel les granules de phosphate sont calibrées à un diamètre d'environ 2 à environ 7 mm, en particulier environ 5 mm.

20 Le calibrage du phosphate permet est effectué pour les mêmes raisons que ci-dessus.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un procédé de préparation de granules, tel que défini ci-dessus, dans lequel l'hydrocolloïde est de l'alginate de sodium à une concentration dans la solution d'immersion comprise d'environ 10 à 30 g/l, en particulier 20 g/l, la tourbe dans la solution d'immersion est à une concentration d'environ 20 à 30 g/l, en
25 particulier 25 g/l, et la solution aqueuse de cation divalent dans la solution d'immersion est du chlorure de calcium à une concentration comprise d'environ 50 à environ 150 g/l, en particulier 100 g/l.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de fertilisation d'espèces forestières telles que *Pinus spp.*, *Quercus spp.*, *Isobertinia glauca*, comprenant la mise en
30 contact de plants forestiers avec les granules polymérisés comprenant au moins un inoculum ectomycorhizien, tels que définis ci-dessus, par élément unitaire de culture.

L'expression « élément unitaire de culture » désigne ici une graine, semence, grain, fruit, pépin, noyau ou une plante sans être limité à ceux-ci permettant d'obtenir une culture forestière.

En particulier, l'élément unitaire de culture correspond à une graine ou un plant.

Par mise en contact de plants forestiers avec les granules, il faut comprendre
5 l'introduction des granules dans, par exemple, un bocal, récipient, pot... contenant un substrat de plantation et un jeune plant forestier ou une graine de plant forestier ou une semence....

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne un procédé de fertilisation d'espèces forestières tel que défini ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

- a. préparation de granules comprenant un inoculum ectomycorhizien, tels que définis
10 ci-dessus,
- b. mise en contact de plants forestiers avec des granules à une dose d'environ 1 g de granules à environ 5 g de granules, en particulier d'environ 1 g de granules, par élément unitaire de culture, notamment graine ou plant.

15 Dans un mode de réalisation avantageux, l'inoculum ectomycorhizien est constitué d'au moins un champignon ectomycorhizien du genre *Hebeloma*, et/ou du genre *Scleroderma*, et/ou du genre *Laccaria*, en particulier le champignon du genre *Hebeloma* est choisi parmi *Hebeloma anthracophilum*, *Hebeloma cistophilum*, *Hebeloma crustuliniforme*,
20 *Hebeloma fastibile*, *Hebeloma mesophaeum*, *Hebeloma pallidum*, *Hebeloma radicosum*,
Hebeloma sarcophyllum et *Hebeloma sinapizans*, notamment *Hebeloma crustuliniforme*, le champignon du genre *Scleroderma* est choisi parmi le groupe constitué de: *Scleroderma dyctiosporum* et *Scleroderma verrucosum* et préférentiellement *Scleroderma verrucosum* et le champignon du genre *Laccaria* est choisi parmi le groupe constitué de: *Laccaria amethystea*, *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Laccaria proxima*, *Laccaria purpureo-*
25 *badia* et *Laccaria tortilis*, en particulier *Laccaria bicolor*.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de fertilisation d'espèces
30 céréalières, fourragères, maraîchères, fruitières ou horticoles, comprenant la mise en contact de plants céréaliers, fourragers, maraîchers, fruitiers ou horticoles avec les granules polymérisés comprenant au moins un inoculum mycorhizien à arbuscules, tels que définis ci-dessus, par élément unitaire de culture.

Par mise en contact de plants céréaliers, fourragers, maraîchers, fruitiers ou horticoles avec les granules, il faut comprendre l'introduction des granules dans, par exemple, un bocal, récipient, pot... contenant un substrat de plantation et un jeune plant céréaliier, fourrager, maraîcher, fruitier ou horticole ou une graine de plants céréaliier, fourrager, maraîcher, fruitier ou horticole ou une semence....

L'expression « élément unitaire de culture » désigne ici une graine, semence, grain, fruit, pépin, noyau ou une plante sans être limité à ceux-ci permettant d'obtenir une culture céréalière, fourragère, maraîchère, fruitière ou horticole.

En particulier, l'élément unitaire de culture correspond à une graine ou un plant.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne un procédé de fertilisation d'espèces céréalières, fourragères, maraîchères, fruitières ou horticoles, tel que défini ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

- a. préparation de granules comprenant au moins un inoculum endomycorhizien, tels que définis ci-dessus,
- b. mise en contact de plants forestiers avec des granules à une dose d'environ 1 g de granules à environ 5 g de granules, en particulier d'environ 1 g de granules, par élément unitaire de culture, notamment graine ou plant

Dans un mode de réalisation avantageux, l'inoculum mycorhizien à arbuscules est constitué d'au moins un champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus*, en particulier le champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus* est choisi parmi le groupe constitué de: *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum* et *Glomus intraradices*, en particulier *Glomus intraradices*.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de fertilisation d'espèces forestières telles que *Pinus spp.*, *Quercus spp.*, *Isobertia glauca*, ou d'espèces céréalières, fourragères, maraîchères, fruitières ou horticoles, comprenant la mise en contact de plants forestiers ou de plants céréaliers, fourragers, maraîchers, fruitiers ou horticoles avec les granules polymérisés comprenant au moins un inoculum ectomycorhizien et au moins un inoculum mycorhizien à arbuscules, tels que définis ci-dessus, par élément unitaire de culture.

La mise en contact est telle que défini ci-dessus pour les plants forestiers et les plants céréaliers, fourragers, maraîchers, fruitiers ou horticoles.

L'expression « élément unitaire de culture » désigne ici une graine, semence, grain, fruit, pépin, noyau ou une plante sans être limité à ceux-ci permettant d'obtenir une culture forestière ou une culture céréalière, fourragère, maraîchère, fruitière ou horticole.

En particulier, l'élément unitaire de culture correspond à une graine ou un plant.

5 Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne un procédé de fertilisation d'espèces forestières, céréalières, fourragères, maraîchères, fruitières ou horticoles, tel que défini ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

- a. préparation de granules comprenant au moins un inoculum ectomycorhizien et au moins un inoculum mycorhizien à arbuscules, tels que définis, ci-dessus
- 10 b. mise en contact de plants forestiers avec des granules à une dose d'environ 1 g de granules à environ 5 g de granules, en particulier d'environ 1 g de granules, par élément unitaire de culture, notamment graine ou plant

Dans un mode de réalisation avantageux, l'inoculum ectomycorhizien est constitué d'au moins un champignon ectomycorhizien du genre *Hebeloma*, et/ou du genre
15 *Scleroderma*, et/ou du genre *Laccaria*, et d'au moins un champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus*,

en particulier le champignon du genre *Hebeloma* est choisi parmi *Hebeloma anthracophilum*, *Hebeloma cistophilum*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Hebeloma fastibile*, *Hebeloma mesophaeum*, *Hebeloma pallidum*, *Hebeloma radicosum*, *Hebeloma*
20 *sarcophyllum* et *Hebeloma sinapizans*, notamment *Hebeloma crustuliniforme*, le champignon du genre *Scleroderma* est choisi parmi le groupe constitué de: *Scleroderma dyctiosporum* et *Scleroderma verrucosum* et préférentiellement *Scleroderma verrucosum* et le champignon du genre *Laccaria* est choisi parmi le groupe constitué de: *Laccaria amethystea*, *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Laccaria proxima*, *Laccaria purpureo-*
25 *badia* et *Laccaria tortilis*, en particulier *Laccaria bicolor* et en particulier le champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus* est choisi parmi le groupe constitué de: *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum* et *Glomus intraradices*, en particulier *Glomus intraradices*.

30 **EXEMPLES :**

Exemple 1 : Mode opératoire général pour préparer un inoculum mycorhizien (ectomycorhizien ou mycorhizien à arbuscules ou ectomycorhizien et mycorhizien à arbuscules)

Les modes opératoires qui peuvent être utilisés sont décrits dans les références suivantes :

- 5 DUPONNOIS, R. & GARBAYE, J. (1991). Techniques for controlled synthesis of the Douglas fir-*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Annales des Sciences Forestières*, 48: 239-251.
- DUPONNOIS, R. & GARBAYE, J. (1991). Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in vitro and in glasshouse conditions. *Annales des Sciences Forestières*, 48: 239-251.
- 10 DUPONNOIS, R., PLENCHETTE, C. & BA, A.M. (2001). Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. *European Journal of Soil Biology*, 37: 181-186.

Exemple 2 : Préparation des granules contenant un inoculum mycorhizien (ectomycorhizien ou mycorhizien à arbuscules ou ectomycorhizien et mycorhizien à arbuscules)

Etape 1 : Préparation de l'inoculum mycorhizien selon l'exemple 1

Etape 2 : Récolte du mycélium par filtration, lavage du mycélium à l'eau courante puis broyage.

- 20 **Etape 3 :** Calibrage des granules de phosphate naturel (diamètre 5 mm) et lavage des granules à l'eau courante

Etape 4 : Préparation de la solution d'immersion pour les granules composée de : alginate de sodium (20 g.l⁻¹), tourbe broyée préalablement stérilisée (50 g.l⁻¹) et de mycélium fongique (1 g poids sec par litre de solution)

- 25 **Etape 5 :** Immersion des granules calibrés (900 g) dans la solution d'immersion à température ambiante (20-25°C) pendant 90 min.

Etape 6 : Immersion des granules de l'étape 5 dans une solution de chlorure de calcium (CaCl₂, 100 g.l⁻¹) pendant 150 min à température ambiante (20-25°C)

Etape 7 : Elimination des traces de CaCl₂ par un lavage à l'eau courante

Etape 8 : Conservation des granules à 4°C.

Exemple 3 : Comparaison de la mycorhization contrôlée de *Pinus halepensis* par la souche de champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* dans différentes consitions

3.1 :Après 4 mois de culture dans un sol sableux (Tableau I)

La culture est effectuée telle que décrite dans l'article Ouahmane et al. ((2009) ; Responses of *Pinus halepensis* growth, soil microbial catabolic functions and phosphate-solubilizing bacteria after rock phosphate amendment and ectomycorrhizal inoculation, Plant Soil DOI 10.1007/s11104-008-9882-z)

Tableau I

	Traitements			
	Témoin	<i>S. verrucosum</i> (inoc T/V) ⁽¹⁾	<i>S. verrucosum</i> (inoc BA) ⁽²⁾	<i>S. verrucosum</i> + KRP ⁽³⁾ (inoc BA)
Biomasse aérienne (mg poids sec)	159,3 a ⁽⁴⁾	246,9 b	250,4 b	342,6 c
Biomasse racinaire (mg poids sec)	68,6 a	86,5 b	85,4 b	100,1 c
Teneur en azote des aiguilles (%)	1,3 a	1,6 b	1,7 b	1,8 b
Teneur en phosphore des aiguilles (g.kg ⁻¹)	7,7 a	9,4 b	9,2 b	11,1 c

⁽¹⁾ : Inoculum Tourbe vermiculite appliqué à T = 0 à raison de 10% (v/v) dans chaque pot.

⁽²⁾ : Inoculum Billes alginate de Ca appliqué à raison de 10 billes par pot.

⁽³⁾ Billes d'alginate de Calcium fabriquées avec un support physique constitué de granules de phosphate naturel selon l'exemple 2 (10 billes par pot)

⁽⁴⁾ Les valeurs d'une même ligne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après l'analyse de variance à un facteur contrôlé ($P < 0,05$).

5 Le tableau I montre qu'après 4 mois de culture :

- les pins cultivés avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de la tourbe (2^{ème} colonne traitements) ou avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de l'alginate de calcium (3^{ème} colonne traitements) ont développé une biomasse aérienne et racinaire significativement plus élevée que celle observée avec le témoin ;
- il n'y a pas de différence significative entre la culture avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de la tourbe (2^{ème} colonne traitements) comparée à un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de l'alginate de calcium (3^{ème} colonne traitements) ;
- les pins cultivés avec les granules de l'invention (4^{ème} colonne traitements) ont développé une biomasse aérienne et racinaire significativement plus élevée que celle observée avec la culture des pins avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de la tourbe (2^{ème} colonne traitements) comparée à un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de l'alginate de calcium (3^{ème} colonne traitements), montrant la synergie entre les différents constituants de l'invention;

3.2 :Après 12 mois de culture dans un sol sableux (Tableau II) (après transfert des plants mycorhizes dans des pots de 10 litres)

25

TABLEAU II

	Traitements					
	Témoin	KRP ⁽¹⁾	<i>S. verrucosum</i> (inoc T/V) (2)	<i>S. verrucosum</i> + KRP (inoc T/V)	<i>S. verrucosum</i> (inoc BA) ⁽³⁾	<i>S. verrucosum</i> + KRP ⁽⁴⁾ (inoc BA)

Biomasse aérienne (mg poids sec)	321,2 a ⁽⁵⁾	318,6 a	426,7 b	534,6 c	446,7 b	648,9 d
Biomasse racinaire (mg poids sec)	158,9 a	149,7 a	248,9 b	298,2 c	252,4 b	320,6 d
Teneur en azote des aiguilles (%)	1,2 a	1,1 a	1,6 b	1,7 b	1,7 b	1,8 b
Teneur en phosphore des aiguilles (g.kg ⁻¹)	4,1 a	4,3 a	7,2 b	9,7 c	7,4 b	9,9 c

⁽¹⁾ : Phosphate naturel appliqué à 0,1% (w/v) dans la couche superficielle des pots (0 – 10 cm)

⁽²⁾ : Inoculum Tourbe vermiculite appliqué à T = 0 à raison de 10% (v/v) dans chaque pot

⁽³⁾ : Inoculum Billes alginate de Ca appliqué à raison de 10 billes par pot à T = 0

⁽⁴⁾ Billes d'alginate de Calcium fabriquées avec un support physique constitué de granules de

5 phosphate naturel selon l'exemple 2 (10 billes par pot)

⁽⁵⁾ Les valeurs d'une même ligne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après l'analyse de variance à un facteur contrôlé (P < 0.05)

Le tableau II montre qu'après 12 mois de culture :

- les pins cultivés avec du phosphate naturel uniquement (2^{ème} colonne traitements) ne montrent pas de différence significative de la biomasse aérienne obtenue par rapport à celle du témoin (1^{ère} colonne traitements);
- les pins cultivés avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de la tourbe (3^{ème} colonne traitements) ou avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de l'alginate de calcium (5^{ème}

colonne traitements) ont développé une biomasse aérienne et racinaire significativement plus élevée que celle observée avec le témoin ou le phosphate naturel;

- 5 - il n'y a pas de différence significative entre la culture avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de la tourbe (3^{ème} colonne traitements) comparée à un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de l'alginate de calcium (5^{ème} colonne traitements) ;
- 10 - les pins cultivés avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum*, de la tourbe et du phosphate naturel (4^{ème} colonne traitements) ont développé une biomasse aérienne et racinaire significativement plus élevée que celle observée les pins cultivés avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de la tourbe (3^{ème} colonne traitements) ou avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum* et de l'alginate de calcium (5^{ème} colonne traitements) ;
- 15 - les pins cultivés avec les granules de l'invention (6^{ème} colonne traitements) ont développé une biomasse aérienne et racinaire significativement plus élevée que celle observée avec la culture des pins cultivés avec un champignon ectomycorhizien *Scleroderma verrucosum*, de la tourbe et du phosphate naturel (4^{ème} colonne traitements), montrant la synergie entre les
- 20 différents constituants de l'invention démontrant ainsi non seulement l'action intrinsèque du champignon sur le développement de la plante mais également son action sur la dissolution du phosphate qui par ailleurs est stimulée par enrobage sur les granules comparée à des granules non enrobés (4^{ème} colonne traitements) qui évite la dispersion du phosphate.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Granules comprenant du phosphate inorganique, de la tourbe, au moins un inoculum mycorhizien, à l'exception de nutriments ou de germe de malt, lesdits granules étant enrobés dans une matrice à base d'au moins un hydrocolloïde polymérisé.
- 10 2. Granules selon la revendication 1, constitués de phosphate inorganique, de tourbe, d'au moins un inoculum mycorhizien, lesdits granules étant enrobés dans une matrice à base d'au moins un hydrocolloïde polymérisé.
- 15 3. Granules selon la revendication 1 ou 2, dans lesquels l'inoculum mycorhizien comprend au moins un champignon ectomycorhizien, du genre *Hebeloma*, et/ou du genre *Scleroderma*, et/ou du genre *Laccaria*,
- 20 4. Granules selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle l'inoculum mycorhizien comprend au moins un champignon mycorhizien à arbuscules du genre *Glomus*.
- 25 5. Granules selon l'une des revendications 1 à 4, dans lesquels le poids d'inoculum mycorhizien est compris de 0,05% (p/p) à 0,2% (p/p) par rapport au poids total des granules.
6. Granules selon l'une des revendications 1 à 5, dans lesquels le poids de tourbe est comprise de 2,2% (p/p) à 3,3% (p/p) par rapport au poids total des granules.
7. Granules selon l'une des revendications 1 à 6, dans lesquels le poids de phosphate inorganique est compris de 36,7% (p/p) à 37,8% (p/p) par rapport au poids total des granules.
- 30 8. Granules selon l'une des revendications 1 à 7, dans lesquels le phosphate inorganique est du phosphate de roche ou de la podzolane.

9. Granules selon la revendication 8 ou 9, dans lesquels le phosphate inorganique est calibré à un diamètre de 2 mm à 7 mm.
- 5 10. Granules selon l'une des revendications 1 à 9, dans lesquels le poids d'hydrocolloïde polymérisé est compris de 1,7%(p/p) à 2,8%(p/p) par rapport au poids total des granules.
11. Granules selon la revendication 10, dans lequel l'hydrocolloïde polymérisé est de l'alginate de calcium.
- 10 12. Utilisation de granules comprenant au moins un champignon ectomycorhizien, tels que définis dans l'une des revendications 1 à 3 et 5 à 11, dans des espaces destinés aux cultures forestières.
- 15 13. Utilisation de granules comprenant au moins un champignon mycorhizien à arbuscules, tels que définis dans l'une des revendications 1, 2 et 4 à 11, dans des espaces destinés aux cultures, choisis parmi les cultures céréalières, fourragères, maraîchères, fruitières ou horticoles.
- 20 14. Utilisation selon la revendication 12 ou 13, dans laquelle la proportion de granule pour 100 ml de substrat contenant un élément unitaire de culture est comprise de 0,05 % (p/v) à 0,5 % (p/v).
- 25 15. Procédé de préparation de granules, comprenant une étape de polymérisation de granules de phosphate inorganique imprégnés de tourbe, d'au moins un inoculum mycorhizien et d'au moins un hydrocolloïde avec une solution aqueuse d'un cation divalent choisi parmi le chlorure de calcium, l'acétate de zinc, l'acétate de calcium, le carbonate de calcium, le phosphate de calcium, le chlorure d'aluminium ou des dialdéhydes.
- 30 16. Procédé de préparation de granules selon la revendication 15, comprenant les étapes suivantes:

- a) multiplication d'au moins un mycélium mycorhizien en fermenteur sur un milieu nutritif adapté selon la souche fongique cultivée pour obtenir un mycélium mycorhizien multiplié,
- b) récolte dudit mycélium par filtration, lavage du mycélium à l'eau puis broyage pour obtenir un mycélium mycorhizien multiplié récolté,
- c) calibrage de granules de phosphate inorganique, et lavage des granules à l'eau pour obtenir des granules calibrés lavés,
- d) préparation de la solution d'immersion pour les granules composée de :
 - i. au moins un hydrocolloïde,
 - ii. de tourbe broyée préalablement stérilisée, et
 - iii. de mycélium mycorhizien,
- e) immersion des granules calibrés lavés obtenus à l'étape c) dans la solution d'immersion pour obtenir des granules imprégnés d'hydrocolloïde, de tourbe et de mycélium,
- f) introduction des granules imprégnés dans une solution aqueuse d'un cation divalent pour obtenir des granules polymérisés,
- g) élimination des traces de cation divalent par un lavage à l'eau pour obtenir granules polymérisés lavés,

17. Procédé de préparation de granules selon la revendication 16, dans lequel les granules de phosphate sont calibrées à un diamètre de 2 à 7 mm.

18. Procédé de préparation de granules selon la revendication 16 ou 17, dans lequel l'hydrocolloïde est de l'alginate de sodium à une concentration dans la solution d'immersion comprise de 10 à 30 g/l, la tourbe dans la solution d'immersion est à une concentration d'environ 20 à 100 g/l, et la solution aqueuse de cation divalent dans la solution d'immersion est du chlorure de calcium à une concentration comprise d'environ 50 à environ 150 g/l.

19. Procédé de fertilisation d'espèces forestières telles que *Pinus spp.*, *Quercus spp.*, *Isobertia glauca*, comprenant la mise en contact de plants forestiers avec les granules polymérisés tel que définis dans les revendications 1 à 3 et 5 à 11, par élément unitaire de culture.

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

WO 2007/066136 A1 (ROK OVERSEAS ORGANIC TRADING L [GB]; ANTHONY MICHAEL [IE]; RUSSELL RON)
14 juin 2007 (2007-06-14)

DATABASE WPI Week 199320 Thomson Scientific, London, GB; AN 1993-163583 XP002655590, & JP 5 095780 A (IDEMITSU KOSAN CO LTD)
20 avril 1993 (1993-04-20)

EP 0 092 990 A2 (NAT RES DEV [GB])
2 novembre 1983 (1983-11-02)

EP 0 485 229 A1 (SHELL INT RESEARCH [NL])
13 mai 1992 (1992-05-13)

WO 2009/009805 A1 (BIOCULT PTY LTD [ZA]; VENTER MARIANNE WILMA [ZA])
15 janvier 2009 (2009-01-15)

US 2008/064598 A1 (DE ROUGEMONT MICHEL [CH] ET AL)
13 mars 2008 (2008-03-13)

US 5 021 350 A (JUNG GERARD [FR] ET AL)
4 juin 1991 (1991-06-04)

US 5 096 481 A (SYLVIA DAVID M [US] ET AL)
17 mars 1992 (1992-03-17)

DATABASE WPI Week 201119 Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-A04637 XP002655591, & CN 101 889 587 A (UNIV NANJING FORESTRY)
24 novembre 2010 (2010-11-24)

OUAHMANE L ET AL: "Responses of Pinus halepensis growth, soil microbial catabolic functions and phosphate-solubilizing bacteria after rock phosphate amendment and ectomycorrhizal inoculation", PLANT AND SOIL ; AN INTERNATIONAL JOURNAL ON PLANT-SOIL RELATIONSHIPS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 320, no. 1-2, 23 janvier 2009 (2009-01-23), pages 169-179, XP019686718, ISSN: 1573-5036

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

N° d'enregistrement national : 1061126

N° de publication : 2969464

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT